

**SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK**

**DNA-POLIMERAZA: MEHANIZAMI KOJIMA SE
OSTVARUJE VISOKA VJERNOST REPLIKACIJE**

**DNA-POLYMERASE: MECHANISMS OF REPLICATION
FIDELITY**

SEMINARSKI RAD

Kristina Poljak

**Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)**

Mentor: doc. dr. sc. Ita Grui -Sovulj

Zagreb, 2009.

SADRŽAJ

SADRŽAJ	2
1. UVOD	3
2. STRUKTURA DNA-POLIMERAZA	4
3. MEHANIZAMI VJERNE REPLIKACIJE DNA	7
3.1. Po etna selekcija supstrata	9
3.2. Doprinos induciraju eg pristajanja	11
3.3. Egzonukleazna aktivnost	13
3.4. Replikacijsko proklizavanje	16
3.4.1. Replikacijsko proklizavanje DNA kalupa i po etnice	17
3.4.2. Inicijacija proklizavanja	18
3.4.3. Uzroci proklizavanja	19
3.4.4. Popravak grešaka nastalih proklizavanjem DNA	19
4. TRANSLEZIJSKA SINTEZA SPECIJALIZIRANIM DNA-POLIMERAZAMA	20
5. LITERATURA	23
6. SAŽETAK	24
7. SUMMARY	25

1. UVOD

Vjernost sinteze DNA je od velikog interesa znanstvenicima već pola stoljeća, jer je ona potrebna za održavanje genetičke informacije kroz mnoge generacije te za izbjegavanje mutacija koje mogu inicirati ili promovirati bolesti kao što su rak ili neurodegenerativne bolesti. Međutim, mutacije mogu biti evolucijski pozitivne te je stoga potrebno pronaći ravnotežu između vjernosti replikacije i potrebnih pogrešaka. Mutacije nastale tijekom replikacije mogu se popraviti tijekom ili poslije replikacije pomoću niza mehanizama kao što su popravak krivo sparenih baza te nekoliko tipova ekscizijskog popravka nukleotida. Ali, u ovom radu ćemo se fokusirati na mehanizme koji otkrivaju i popravljaju greške tijekom sinteze DNA, mehanizme koji su svojstveni DNA-polimerazi.

DNA-polimeraze spadaju u veliku obitelj enzima koji imaju ključnu ulogu u prijepisu genetičke informacije od DNA preko RNA do proteina. Oni sintetiziraju lanac DNA prema određenom kalupu i time učestvuju u replikaciji DNA te sudjeluju u popravku genoma. Njihovo izvanredno svojstvo je da taj posao rade izuzetnom brzinom i uinkovitošću. Na primjer, T7-DNA-polimeraza katalizira sintezu DNA brzinom od 300-500 ugrađenih baza u sekundi pri čemu ugradi jednu krivu bazu na 10^5 do 10^6 baza. A kada i napravi ovakvu grešku, ona staje kako bi ju ispravila, te od 10^3 do 10^4 krivo ugrađenih baza samo jednu ne popravi. Kada ovo sve zbrojimo ispada da DNA-polimeraza ima frekvenciju grešaka od jedne krivo ugrađene baze na 10^8 do 10^{10} baza (Johnson 1993). Ipak, različite DNA-polimeraze repliciraju i popravljaju genom promjenjivim stupnjevima procesivnosti i točnosti.

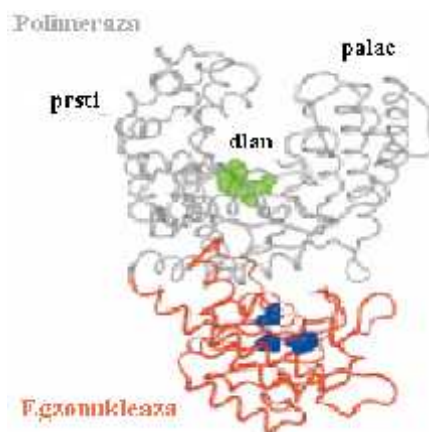
2. STRUKTURA DNA-POLIMERAZA

Sinteza DNA ide uz pomoć šest različitih obitelji DNA-polimeraza (A, B, C, X, reverzna transkriptaza i Y) koje su specijalizirane za replikaciju genoma, uklanjanje po etnica i spajanje Okazakijevih fragmenata, ispunjavanje rupa u genomu, replikaciju sklonu greškama i translezijsku sintezu (Tab. 1.) (Patel 2001).

Tablica 1. Reprezentativni članovi različitih obitelji DNA-polimeraza. Preuzeto i prilagođeno iz Patel 2001.

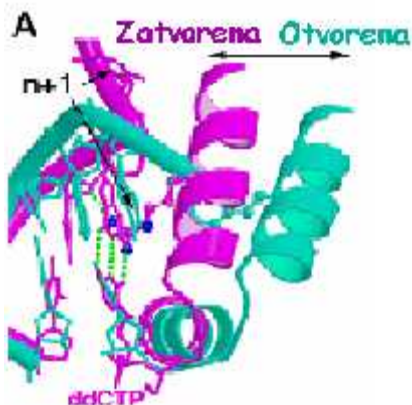
Obitelj	Prokariotske	Eukariotske	Arhealne	Viralne
A	Pol I	Pol γ , δ , ϵ		T3, T5, T7 Pol
B	Pol II	Pol α , β , β'	Pol BI, BII	HSV, RB69, T4, T6 Pol
C	Pol III (ϵ)			
X		Pol η , θ , Tdt		
RT		Telomeraza		Reverzna transkriptaza
Y	Pol IV, V	Pol κ , λ		

Sve DNA-polimeraze su građene od tri osnovne domene koje su prvo bile identificirane u Klenowljevom fragmentu DNA-polimeraze I. Zbog njihove strukturne sličnosti s desnom rukom, kolokvijalno ih zovemo domene dlan, prsti i palac (Slika 1).



Slika 1. Vrpnasti prikaz DNA-polimeraze I iz *Escherichia coli* na kojem možemo vidjeti dvije odvojene domene: Klenowljev fragment s tri opisane domene i egzonukleaznu domenu. Preuzeto iz Kunkel 2000.

Domena dlan je topološki najo uvanija domena, te u svom aktivnom mjestu sadrži dva visoko o uvana aspartata koji koordiniraju metalne ione koji se također nalaze u aktivnom mjestu te pružaju platformu za mali utor DNA (Patel 2001). Na primjeru DNA-polimeraze možemo vidjeti kako Arg283 lociran u α -zavojnici N ima važnu ulogu u aktivnom mjestu, jer njegovom zamjenom nekom drugom aminokiselinom dolazi do značajnog smanjenja vjernosti replikacije. Bojni lanac Arg 283 ostvaruje van der Waalsove interakcije s malim utorom DNA kalupa i vodikovim vezama je povezan sa šećerom prethodnog nukleotida u kalupu (Slika 2) (Kunkel 2000). Iznimka su DNA-polimeraze obitelji X koje nemaju domenu dlan homolognu s ostalim polimerazama, te su opisane kao “ljevoruke” (Beard 2003).



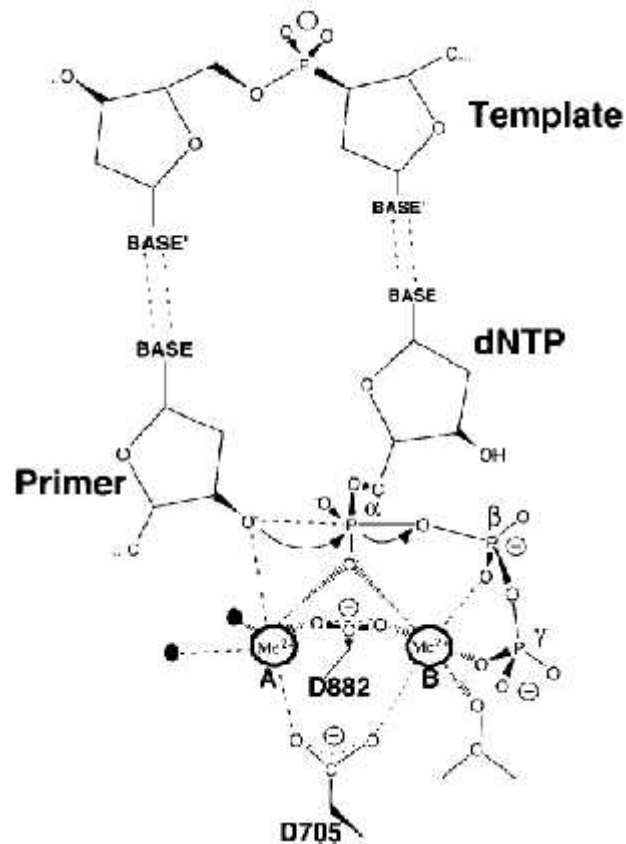
Slika 2. Interakcije baznog para u aktivnom mjestu DNA-Pol. U zatvorenoj konformaciji enzima (ljubičasto) imamo van der Waalsove interakcije između bojnog ogranka Arg283 (kuglice na štapiću) i baze kalupa, te vodikove veze sa šećerom n-1 nukleotida kalupa. Nasuprot, u otvorenoj konformaciji (zeleno) Arg283 nema interakcija s DNA. Preuzeto iz Osheroff 2000.

Domena prsti, bogata α -zavojnicama, pruža važne interakcije s nadolazećim nukleotidom i komplementarnom bazom kalupa. Domena palac se uglavnom sastoji od paralelnih i antiparalelnih α -zavojnica, te njene interakcije s malim utorom duplekta kalupa i po etnice povećavaju procesivnost sinteze DNA (Patel 2001). Mnoge polimeraze iz obitelji A i B sadrže i odvojenu domenu koja ima 3'-5' egzonukleaznu korektivnu aktivnost (Slika 1). Kod njih, egzonukleazna domena se može nalaziti prostorno s obje

strane polimeraznog aktivnog mjesta, dok se kod DNA-polimeraze III (*Escherichia coli*) ona nalazi na posebnoj podjedinici (MutD) (Franklyn 2008).

O to je da DNA-polimeraze imaju složene strukture u kojima se mjesto sinteze i mjesto popravka pogreške nalaze na odvojenim domenama, stoga je ključno pitanje kako konformacijske promjene i suradnja između u ovih različitih domena reguliraju katalizu i sveukupnu vjernost replikacije.

fosfodiesterne veze i pirofosfata, nakon čega se enzim vraća u otvorenu konformaciju, čime se omogućuje otpuštanje pirofosfata i translokacija kako bi se započeo novi krug sinteze. U slučaju ugradnje krive baze dolazi do premještanja kraja po etnice iz polimeraznog u egzonukleaznog mjesta gdje se uklanja krivo sparena baza, te se kraj po etnice ponovno vraća u polimerazno mjesto (Johnson 1993).



Slika 4. Mehanizam dva metalna iona djelovanja DNA-polimeraza. Objašnjenje se nalazi u tekstu.

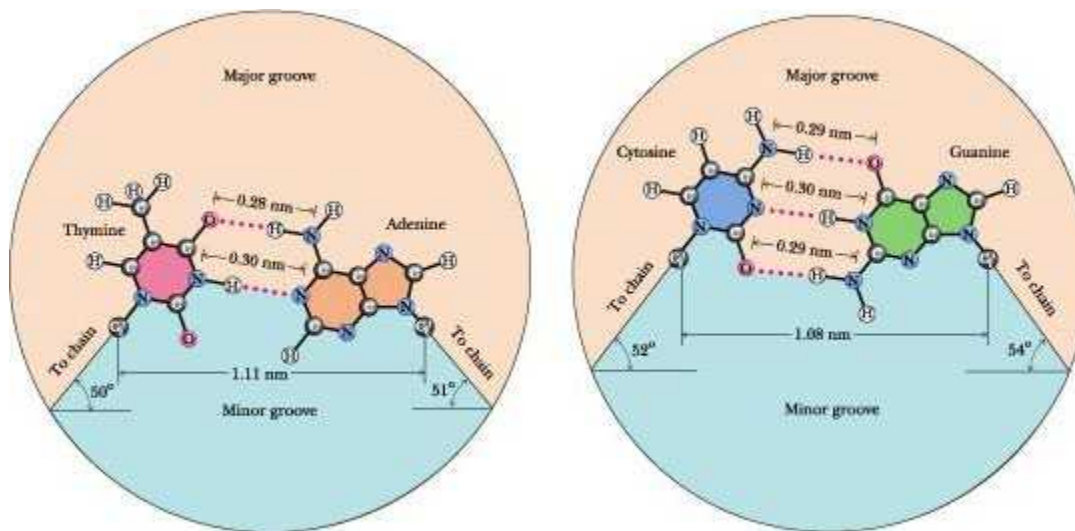
Preuzeto iz Steitz 1999.

U reakciji nastajanja fosfodiesterne veze sudjeluju dva metalna iona kod svih DNA-polimeraza (Slika 4). Aktivno mjesto sadrži dva metalna iona koja stabiliziraju nastalo pentakovalentno prijelazno stanje. Metalni ion A smanjuje pK_a vrijednost 3' OH skupine po etnice te ju tako aktivira za nukleofilni napad na fosfat nadolazećeg nukleotida. Metalni ion B ima dvojnu ulogu, on stabilizira negativni naboj koji nastaje na odlazećem atomu kisika, te stabilizira i fosfate. Metalni ioni su koordinirani karboksilnim

skupinama pokrajnjih aminokiselina, od kojih su samo dva aspartata visoko o uvana kod svih DNA-polimeraza te se nalaze u domeni palac (Steitz 1999).

3.1. Po etna selekcija supstrata

Po etna selekcija supstrata predstavlja prvi korak gdje DNA-polimeraza utje e na vjernost replikacije. U zadnjih dvadesetak godina se mnogo puta potvrdilo da su razlike u slobodnoj energiji izme u pravilno i krivo sparenih baza u vodenoj otopini premale da bi imale velik zna aj u visokoj specifi nosti prema nukleotidima koje imaju mnoge DNA-polimeraze. DNA-polimeraza preferira pravilno sparene u odnosu na krivo sparene baze za faktor 10 do 1000 (Kunkel 2004). Dokazano je da selektivnost ovisi primarno o geometriji baznog para, te da pravilno spareni Watson-Crick bazni parovi normalno sjedaju u aktivno mjesto DNA-polimeraze dok krivo spareni ne (Kunkel 2000).

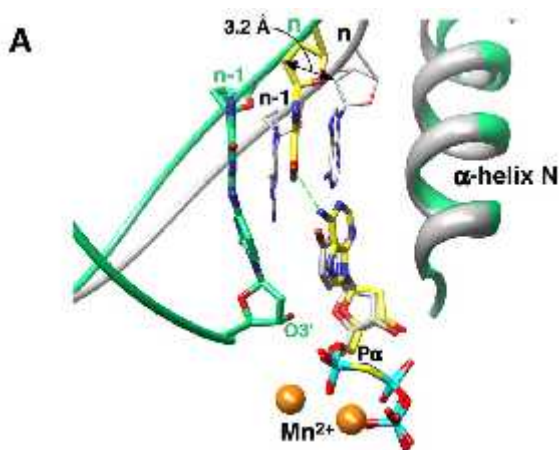


Slika 5. Prikaz Watson-Crick baznih parova gdje možemo vidjeti kako su kutovi glikozidnih veza (50° i 51° za A•T te 52° i 54° za G•C bazni par), udaljenost C1'-C1' atoma (1,11 nm i 1,08 nm) i položaj purinskih N-3 i pirimidinskih O-2 atoma jako sli ni. Preuzeto iz <http://web.virginia.edu/Heidi/chapter12/chp12.htm>.

Geometrije A•T i G•C baznih parova su jako sli ne (Slika 5). Kutovi glikozidnih veza i udaljenosti C1'-C1' atoma vrlo malo variraju unutar pravilnih parova baza, a purinski N-3 i pirimidinski O-2 atomi koji su akseptori vodikovih veza se nalaze na sli nim pozicijama unutar malog utora DNA. Kod krivo sparenih parova baza imamo druga ije kuteve glikozidnih veza, udaljenosti C1'-C1' atoma i smještaj atoma akceptora

vodikovih veza u velikom i malom utoru, ime se omogućuje geometrijska selekcija (Kunkel 2000).

Vodikove veze koje se ostvaruju između nadolazećeg dNTP i kalupa predstavljaju prvi nivo specifičnosti jer susjedni par baza mora odgovarati geometriji duplekse DNA (Kunkel 2004). Polimeraza ispituje lokaciju akceptora i donora vodikovih veza u malom utoru DNA kalupa (Kunkel 2000). Čini se da polimeraze dalje pojačavaju razliku između neto i neto sparenih baznih parova tako što izuzimaju vodu iz svog aktivnog mjesta. Time ograničavaju vezanje krivo sparenog para koji sadrži molekule vode vezane na slobodne akceptore i donore vodikovih veza koji tako postaju preveliki za vezanje u aktivno mjesto (Kunkel 2004). Pokazalo se da su čak i pirimidin•pirimidin parovi baza dovoljno veliki kako bi ih se geometrijski i sterički isključilo jer su na njih vodikovim vezama vezane mnoge molekule vode. Dva pirimidina ne mogu izmijeniti ove molekule vode kako bi se vezali jer nisu komplementarni (Kool 1998).



Slika 6. Prikaz krivo sparenih baza u cik-cak konformaciji. Atomi ugljika krivo sparenih baza su žute, po etnice i -zavojnice zelene, a parovi pravilno sparenih baza sive boje. Kodirajuća baza kalupa je zaokrenuta za 3.2 Å dok je nadolazeći krivi nukleotid pravilno smješten u aktivno mjesto, te je moguća vodikova veza označena zelenim crticama. Preuzeto iz Batra 2008.

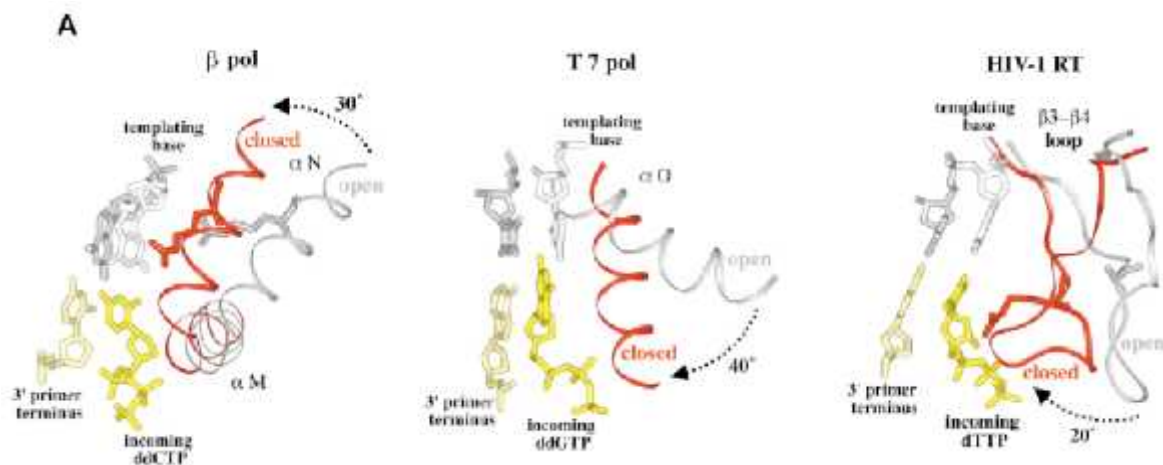
Kada su autori kod DNA-polimeraze koristili nehidrozabilni analog ATP-a AMPCPP (2',3'-metilenadenozin 5'-trifosfat) i Mn^{2+} uspjeli su uhvatiti komplekse pravilno i nepravilno sparenih nukleotida blizu konformacije prijelaznog stanja (Slika 6). Unatož odgovaraju ož lokaciji i orijentaciji nadolazećeg nukleotida u dG-dAMPCPP

kompleksu, po etnica i kalup su zaokrenuti za 3.2 Å u odnosu na svoj položaj u kompleksu s pravilno sparenim nukleotidima. Nastala cik-cak konformacija novougrađene baze sprječava nastajanje normalne Watson-Crick interakcije. Kraj po etnice je zarotiran od nadolazećeg nukleotida, time se povećava udaljenost između 3' OH skupine i fosfata. Kod ove polimeraze odnos $(k_{pol}/K_{d,app})_{corr}/(k_{pol}/K_{d,app})_{incorr}$ je reda veličine 10^4 - 10^5 , time se sugerira da nepovoljna geometrija stvara visoku barijeru slobodne energije za stvaranje ovakvog produkta (Batra 2008).

3.2. Doprinos inducirajućeg pristajanja

U odsutnosti dNTP-a, kompleks DNA-polimeraza•DNA se nalazi u otvorenoj konformaciji. Formacija zatvorenog kompleksa se događa samo s odgovarajućim supstratom, odnosno pravilno sparenim bazama, što je sukladno klasičnom modelu induciranog pristajanja (*eng. induced fit*) (Slika 7). Kod obitelji A i B DNA-polimeraza, nastajanje inicijalnog kompleksa po etnice i kalupa je potpomognuto zatvaranjem domene palac. Naknadno vezanje odgovarajućeg dNTP-a, kako bi nastao zatvoreni kompleks, uključuje i konformacijsko zatvaranje domene prsti, koja poput sendviča zatvara nadolazeći nukleotid i bazu kalupa između DNA dupleksa i proteina. Ovo orijentira 3' OH skupinu po etnice za nukleofilni napad na fosfat nadolazećeg dNTP-a, koji se pravilno smješta pomažući u metalnih iona i susjednih skupina u enzimu (Slika 2) (Francklyn 2008).

Tijekom vezanja DNA (obitelj A DNA-polimeraza) domena palac se rotira prema domeni dlan, što omogućuje visoko obojanim aminokiselinama na vrhu domene palac da vrsto zahvate mali utor DNA. DNA vezana za polimerazu je u konformaciji S oblika; prvi pregib je rezultat kontakta s malim utorom, a drugi pregib nastaje kada se lanac kalup izvije u polimerazno mjesto. Potonji kontakt uzrokuje da se baza kalupa otkloni za više od 90° od osi dvostrukog heliksa. DNA, koja se inače nalazi u B obliku, vezana u aktivnom mjestu je u A obliku (Patel 2001).



Slika 7. Prikaz promjene konformacije aktivnog mjesta nakon dolaska odgovarajućeg nukleotida. Lijevo imamo DNA-Pol β u kompleksu s DNA i ddCTP, u centru je T7-DNA-Pol u kompleksu s DNA i ddGTP i desno je HIV-1 RT u kompleksu s DNA i ddTTP. Vezanjem odgovarajućeg dNTP-a dolazi do velikih konformacijskih promjena u α N DNA-Pol β , α O T7-DNA-Pol i β 3-4 om i HIV-1 RT, koje rotiraju za 30°, 40° i 20°. Ova promjena zatvara dNTP i komplementarnu bazu kalupa. Preuzeto iz Kunkel 2000.

Ranija ispitivanja mehanizma DNA-polimeraza su dovele do zaključka da je zatvaranje domena korak koji određuje sveukupnu brzinu reakcije. Ali kasniji radovi su pokazali da je zatvaranje domena mnogo brže od same polimerizacije te da mnogi predkemijski koraci, koji uključuju dodatne konformacijske promjene, pridonose točnoj selekciji nukleotida. Mnogobrojni elementarni koraci koji slijede početni susret dNTP-a s polimerazom mogu služiti kao kontrolne točke u ovom putu, pridonose i vjernosti replikacije visinom barijere slobodne energije (Francklyn 2008).

Budući da do ugrađivanja krive baze dolazi samo ako se kraj novosintetizirane DNA produži bez popravka, kapacitet DNA-polimeraze da produži lanac krivom bazom je kritičan odrednica vjernosti replikacije. Osim što je svojim aktivnim mjestom u stalnoj interakciji s mjestom polimerizacije, DNA-polimeraza je u interakciji i s dupleksom kalupa i po etnice. Polimerazna domena većine DNA-polimeraza je u interakciji s pet do osam baznih parova dupleksa DNA, većinom su to elektrostatske interakcije sa šećerno-fosfatnim kosturom DNA (Francklyn 2008). Druge interakcije su s malim utorom, uključuju i hidrofobne interakcije i vodikove veze između specifičnih baza lanaca i N-3 atoma purina i O-2 atoma pirimidina. Interakcije u malom utoru su olakšane budući da

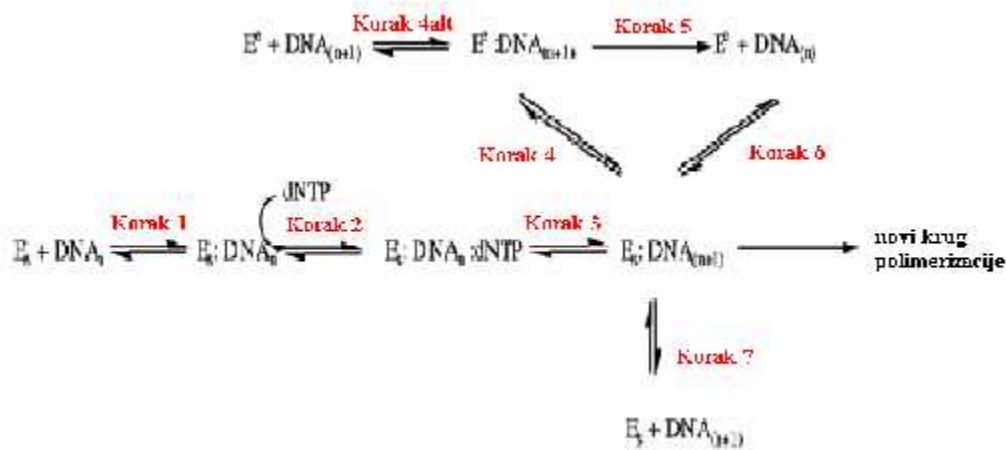
je mali utor, koji se nalazi u blizini aktivnog mjesta, širi i pli i u odnosu na mali utor u normalnoj B-DNA (Kunkel 2000).

3.3. Egzonukleazna aktivnost

Evolucija 3'-5' egzonukleazne i drugih korektivnih aktivnosti je pokazala da po etna selekcija na temelju geometrije, vezanja i induciraju eg pristajanja nisu dovoljni za visoku vjernost replikacije genoma. Pretpostavlja se da egzonukleazna domena pridonosi vjernosti replikacije za 10^2 redova veli ine, nešto manje za nereplikativne polimeraze (Klenowljev fragment) (Kunkel 2004). Korektivne funkcije u polimeraza su smještene u specijaliziranim domenama koji djeluju druga ijim mehanizmima od domena na kojima dolazi do sinteze DNA. Egzonukleazne domene obitelji A i B polimeraza imaju tek djelomi nu strukturnu homologiju, ali imaju sli nu fosfodiesteraznu aktivnost kako bi uklonile krivo sparene nukleotide na 3' kraju po etnice (egzonukleazna aktivnost nije obrnuto od polimerazne aktivnosti koja bi bila pirofosforolizna reakcija) (Steitz 1999). U svim slu ajevima, 3'-5' egzonukleazna domena pokazuje afinitet za jednolan ani 3' OH kraj dupleksa (Francklyn 2008).

Egzonukleazna domena mora raditi u skladu s polimeraznom domenom kako bi se postiglo efektivno ispravljanje grešaka. DNA supstrat se može pomicati izme u polimeraznog i egzonukleaznog aktivnog mjesta bez disocijacije enzima s DNA (Johnson 1993). Ova dva aktivna mjesta su odaljena od 30 do 40 Å, ovisno kako kod koje polimeraze, ali je mogu e da su ona bliža kada je vezan dupleks DNA (Slika 10). Ispitivanja, u kojima je korišten flourescentno obilježen kompleks T4-DNA-polimeraze i DNA po etnice i kalupa, su pokazala da prijenos kraja po etnice iz polimeraznog u egzonukleazno aktivno mjesto uklju uje formaciju preegzonukleaznog kompleksa koji sadrži djelomi no "rastaljenu" po etnicu (Slika 10) (Kunkel 2000). Premještanje DNA iz polimeraznog u egzonukleazno mjesto je popra eno s rotacijom DNA oko svoje osi i "taljenjem" nekoliko nukleotida na 3' kraju po etnice. Vrh domene palac se rotira zajedno s DNA i ta interakcija ostaje jedina visoko o uvana interakcija izme u ove dvije konformacije. Smatra se da vrh domene palac usmjeruje DNA prema egzonukleaznom mjestu (Patel 2001). Budu i da krivo spareni par može sadržavati bilo koji od etiri nukleotida, egzonukleazno mjesto nije specifi no za ijedan nukleotid. Mehanizam

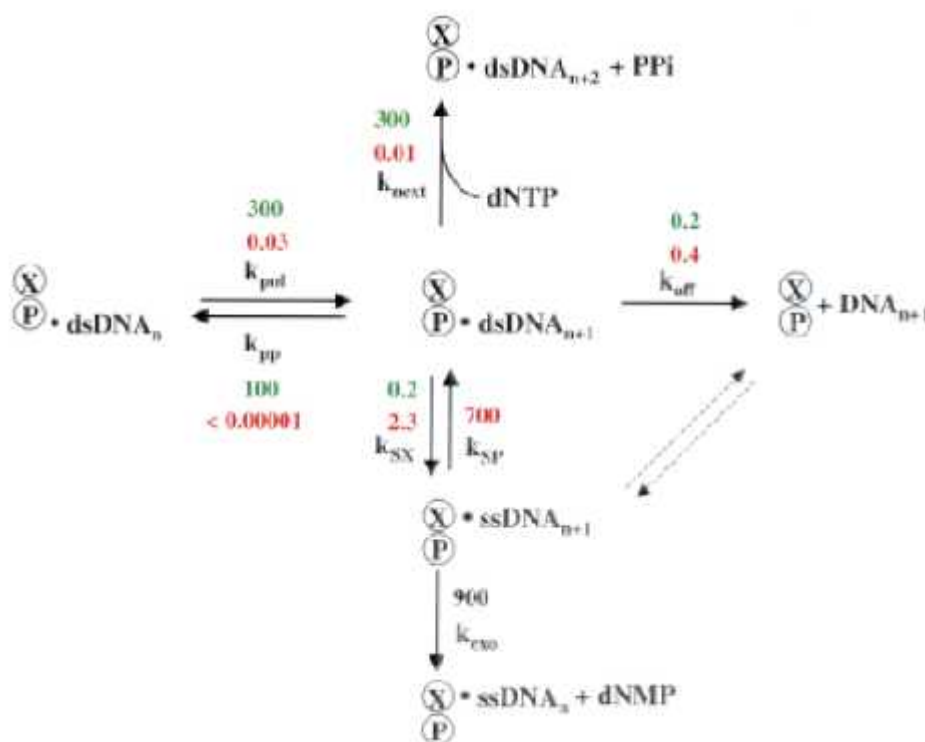
uklanjanja nukleotida tako er mora biti reguliran tako da se limitira broj nukleotida uklonjenih s 3' kraja, kako bi se time izbjeglo nepotrebno uklanjanje pravilno sparenih nukleotida (Francklyn 2008).



Slika 8. Idealizirana shema sinteze i popravljjanja krivo ugrađene baze replikativne DNA-polimeraze.

Objašnjenje u tekstu. Preuzeto iz Francklyn 2008.

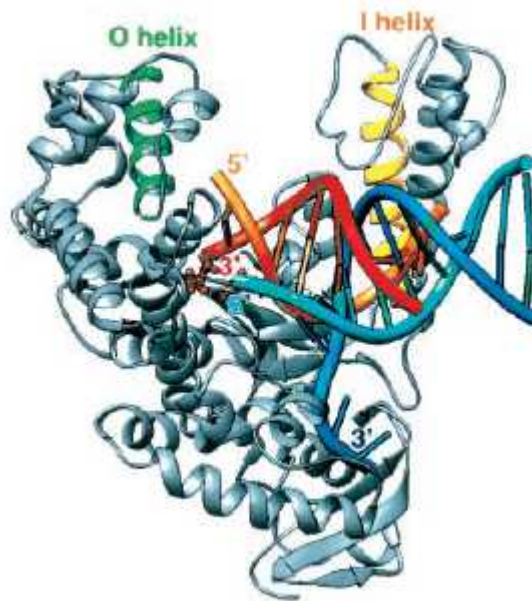
Kao što pokazuje Slika 8., kompleks DNA-polimeraza•po etnica•kalup može imati tri sudbine: sinteza sljedećeg baznog para na temelju kalupa (korak 2, E_s je polimerazno aktivno mjesto enzima); translokacija 3' kraja po etnici u egzonukleazno mjesto, E' (korak 4); ili disocijacija po etnici-kalupa s polimeraze (korak 7). Brzine ovih događaja ovise o prirodi 3' kraja po etnici i jačini vezanja duplekta. Za sve DNA-polimeraze koje posjeduju 3'-5' egzonukleaznu aktivnost, korektivna aktivnost se aktivira kada zbog nepravilnog sparivanja baza dođe do odvajanja lanaca duplekta, time se dozvoljava da se tri do pet nukleotida na kraju po etnici translociraju iz polimeraznog u egzonukleazno mjesto (Francklyn 2008). DNA-polimeraza prepoznaje i krivo sparene baze koje se nalaze i do tri bazna para dalje od samog kraja po etnici (Johnson 1993).



Slika 9. Kinetika shema korektivne aktivnosti T7-DNA-polimeraze. Objasnjeno u tekstu. Preuzeto iz Kunkel 2000.

Dobar primjer kinetike mehanizma popravka je T7-DNA-polimeraza (Slika 9). Zbog velike brzine (900 s^{-1}) degradacije jednolanane DNA, aktivnost egzonukleazne domene je visoko kontrolirana, pogotovo kroz kinetiku translokacije. Ako imamo dupleks s ispravnim parom baza na kraju po etnice, brzina umetanja sljedeće baze (300 s^{-1}) je veća od brzine translokacije u egzonukleazno mjesto ($\sim 2.3 \text{ s}^{-1}$) i od brzine disocijacije po etnice s kalupa (0.2 s^{-1}). Ako na kraju po etnice imamo krivo spareni par baza, brzina daljnje polimerizacije može naglo pasti s 300 na 0.3 s^{-1} , a brzina translokacije u egzonukleazno mjesto će porasti. Jednom kada 3' kraj sjedne u egzonukleazno mjesto, mogući su jedan ili više krugova egzonukleazne degradacije. Ipak, relativno brza (700 s^{-1}) translokacija 3' kraja po etnice iz egzonukleaznog u polimerazno mjesto pruža kinetiku kontrolu kako bi se spriječilo uklanjanje više nukleotida (Johnson 1993). Tako, krivo spajanje na kraju po etnice promovira ispravljanje na dva načina. Prvo, izvlači kraj dupleksa, tj. uzrokuje separaciju lanaca, time olakšavajući i transfer u egzonukleazno

mjesto, a zatim smanjuje brzinu sljedećeg polimerizacijskog događaja, ostavljajući dovoljno vremena za popravak (Franklyn 2008).



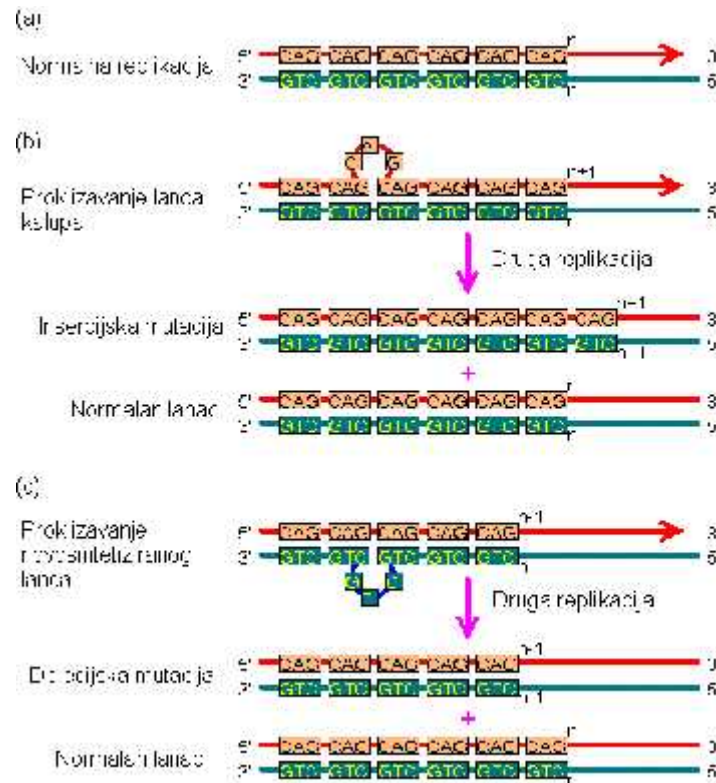
Slika 10. Položeni prikaz molekula DNA vezanih u polimerazno i korektivno mjesto. Kako bi orijentirali ove dvije molekule DNA, autori su položili DNA vezanu u korektivno mjesto Klenowljeva fragmenta i *Taq* polimerazu s DNA vezanom u polimerazno mjesto. 3' kraj lanca počinje su u polimeraznom mjestu nalazi u duplesu s lancem kalupa. Dok je 3' kraj lanca počinje u korektivnom mjestu jednolančani.

Preuzeto iz Steitz 1999.

3.4. Replikacijsko proklizavanje

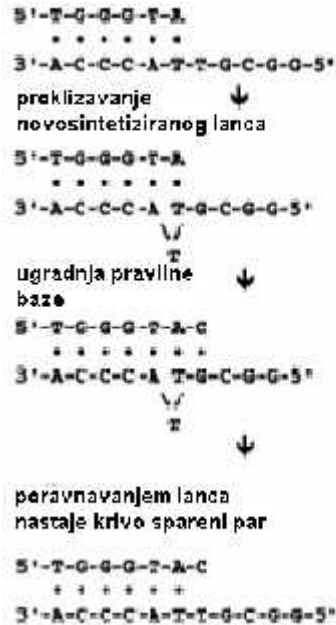
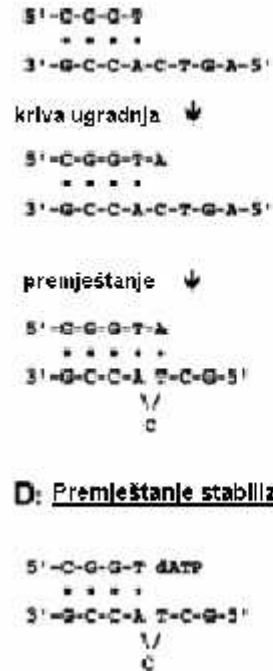
Svaka DNA-polimeraza stvara i delecije i insercije greške prilikom sinteze DNA, koje uzrokuju pomak okvira čitanja tijekom sinteze proteina. Ove greške su jako varijabilne i mogu biti jednako učestale ili rjeđe od grešaka zamjene baza.

3.4.1. Replikacijsko proklizavanje DNA kalupa i po etnice



Slika 11. Mutacije koje nastaju zbog replikacijskog proklizavanja. Objašnjenje u tekst. Preuzeto iz <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch7F3.htm>.

Ovaj najpoznatiji model uključuje proklizavanje lanca tijekom replikacije ponavljaju ih slijedova baza. Ako imamo replikaciju ponavljaju ih slijedova baza, proklizavanje lanca kalupa i po etnice proizvodi iskrivljene (neporavnate) intermedijere koji mogu biti stabilizirani s pravilno sparenim parovima baza. Naredna sinteza DNA vodi ka deleciji ako se nespareni nukleotid nalazi na lancu kalupu, ili ka inserciji ako se nalazi na lancu po etnice (Slika 11). Ovaj model pretpostavlja da bi broj grešaka trebao rasti kako raste broj ponavljaju ih sekvenci, zbog rasta broja pravilno sparenih baza koje mogu stabilizirati neporavnate intermedijere i rasta intermedijera koji mogu nastati. Uz deleciju i inserciju, postoji i treća sudbina proklizavanja lanca. Ako nakon proklizavanja slijedi pravilna ugradnja nukleotida, tada ponovno poravnavanje slijedi prije daljnje sinteze, i dolazi do krive ugradnje baze na kraju lanca što može rezultirati zamjenom baza (Slika 12.B). Ovaj model se još zove i dislokacijska mutageneza (Kunkel 2000).

B: Dislokacija**C: Kriva ugradnja → Premještanje početnice**

Slika 12. Modeli nastajanja grešaka zbog neporavnatosti lanaca. Objašnjenje se nalazi u tekstu. Preuzeto iz Kunkel 2000.

3.4.2. Inicijacija proklizavanja

Iako nisu poznate kinetičke konstante za brzine nastajanja replikacijskih grešaka zbog iskrivljenosti DNA lanca, ipak je poznato kako ono može nastati. Jedan od primjera je kada imamo kraj novonastalog lanca kojeg je teško dalje produžiti zbog krivo ugrađene baze. Predloženo je da se nakon ugrađivanja krive baze novosintetizirani lanac premjesti kako bi nastao iskrivljeni dupleks s pravilnom bazom na kraju novosintetiziranog lanca i time bi se olakšala daljnja polimerizacija (Slika 12.C). Ovaj mehanizam je moguć na bilo kojem mjestu slijeda nukleotida kalupa, bila ona repetitivna ili ne, i nije ograničen na nastajanje grešaka u samo jednom nukleotidu. Proklizavanje može nastati i tijekom disocijacije i reasocijacije DNA-polimeraze. Također, proklizavanje može nastati tijekom procesivne translokacije DNA između polimeraznog i egzonukleaznog aktivnog mjesta (Kunkel 2000).

3.4.3. Uzroci proklizavanja

Kao što smo već naveli, dužina ponavljajućih slijedova baza jako utječe na broj grešaka nastalih proklizavanjem, što su ponavljanja duža, broj grešaka je veći. Također, kod nekih polimeraza (DNA-polimeraza, HIV-1 reverzna transkriptaza) imamo veću deleciju pirimidina nego purina, što se može objasniti slabijim interakcijama slaganja baza unutar DNA nego u pirimidinima nego purinima (Kunkel 1990). Na proklizavanje još utječe u struktura enzima i o tome ovisna interakcija sa supstratom, bilo u aktivnom mjestu ili izvan njega (Kunkel 2000).

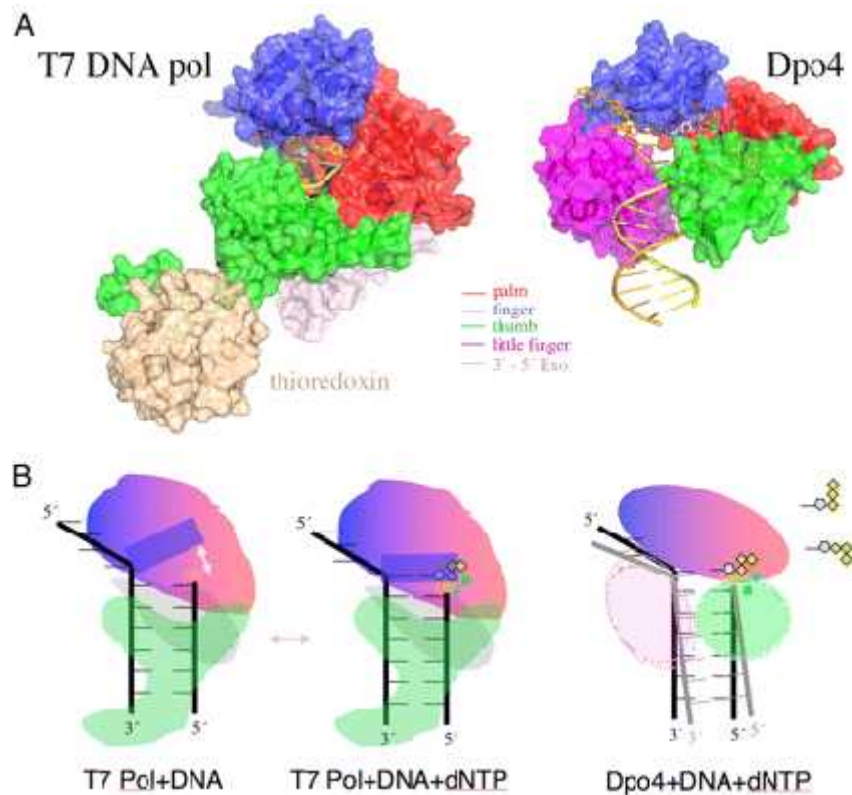
3.4.4. Popravak grešaka nastalih proklizavanjem DNA

Broj grešaka pomaka okvira čitanja raste ako imamo velike koncentracije dNTP ili dNMP koje suprimiraju korektivnu aktivnost DNA-polimeraze, ili ako to kaskadnim mutacijama inaktiviramo egzonukleazu. Ovo nam govori da DNA-polimeraza popravlja iskrivljene intermedijere nastale proklizavanjem. Kinetička istraživanja su pokazala da DNA-polimeraza greške pomaka okvira čitanja neponavlja ih ili kratko ponavlja ih slijedova baza popravljaju jednako u pravilno kao i krivo sparene baze. Ipak, ako imamo duge ponavljajuće slijedove baza efikasnost popravka pada, što je i u skladu s pretpostavkom da kod dužih ponavljajućih slijedova baza, nukleotid viška može biti daleko od kraja polimeraze i time jako slabo ometati polimerizaciju. U ovom slučaju je, kod ponavljajućih slijedova baza DNA, ekscizijski popravak krivo sparenih baza glavni mehanizam ispravljanja grešaka (Kunkel 2000).

4. TRANSLEZIJSKA SINTEZA SPECIJALIZIRANIM DNA-POLIMERAZAMA

Stanice imaju pametnu strategiju kako replicirati preko ošte enja u DNA bez tere enja genoma prekomjernim mutacijama. Translezijska sinteza je alternativni mehanizam uklju en u toleranciju ošte enja DNA kojim se popunjavaju prekidi u DNA nasuprot kalupa koji sadrži ošte enje. Uz replikacijske DNA-polimeraze imamo i posebne DNA-polimeraze specijalizirane za translezijsku sintezu, koje imaju sposobnost ugradnje nukleotida nasuprot ošte enja u DNA na uštrp efikasnosti i vjernosti. Mnoge ove polimeraze su članovi Y obitelji DNA-polimeraza, za koje je karakteristično da nemaju korektivnu egzonukleaznu aktivnost, slabo su procesivne i imaju nisku vjernost replikacije. Za njih je karakteristično da ugrađuju krive nukleotide jednakom ili većom efikasnošću od DNA-polimeraza sa visokom vjernošću u replikacije. Smanjena sposobnost ovih polimeraza da ugrade točan nukleotid je kinetički kontrolirana kako one ne bi bile mutagena prijetnja genomu (Beard 2003).

Strukturne analize DNA-polimeraza obitelji Y su pokazale da one ne podliježu velikim konformacijskim promjenama u domeni prsti, tj. kod njih imamo stalno otvorenu konformaciju enzima čime se omogućuje primanje glomaznih ošte enja dviju baza kalupa DNA u aktivno mjesto (Slika 13). Ove polimeraze uglavnom vežu točne nukleotide visokim afinitetom, ali ih ugrađuju jako sporo zbog slabe stabilizacije prijelaznog stanja, jer je elektrostatski okoliš trifosfatnog dijela nadolazećeg nukleotida kod njih drugačiji (Slika 14) (Beard 2003). Budući da nemaju egzonukleaznu domenu, ovo su polimeraze sa najmanjom vjernošću u replikacije, kada kopiraju neošte en kalup imaju jednu grešku na 10 do 1000 ugrađenih nukleotida (Kunkel 2004).

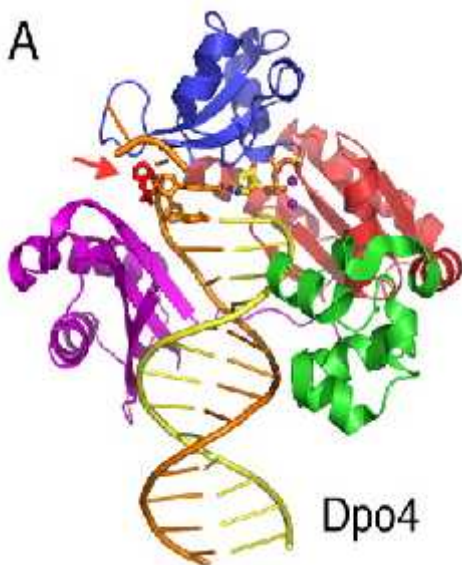


Slika 13. Strukturalna usporedba T7 (A obitelj) i Dpo4 (Y obitelj) DNA-Pol. **A.** Plavo su domene prsti, crveno domene dlana a zeleno domene palca. DNA je prikazana žuto (po etnica) i smeđa (kalup). **B.** Dijagram nastalih konformacijskih promjena uslijed vezanja odgovarajućeg nukleotida kod T7 i Dpo4 DNA-Pol. Vidimo da kod T7 Pol dolazi do pomaka α -zavojnice u domeni prsti (plavi pravokutnik), dok je Dpo4 stalno u otvorenoj konformaciji. Preuzeto iz Yang 2007.

Već smo rekli kako ove polimeraze proizvode veliki broj grešaka po broju sintetiziranih nukleotida, ali budu i da su one odgovorne za sintezu samo malih odsjeka aka DNA one zapravo proizvode puno manje grešaka nego što bi netko pretpostavio. Za razliku od njih, replikativne polimeraze, koje su odgovorne za cijeli genom, zbog velike količine sintetizirane DNA proizvode puno više greški, zato su i razvile korektivnu aktivnost kako bi se taj broj smanjio (Beard 2003).

Poznato je da *E. coli* ima DNA-polimerazu IV (produkt gena *dinB*) i DNA-polimerazu V (UmuD₂'C kompleks) koje obje sudjeluju u SOS mutagenezi. Kod eukariota imamo DNA-Pol α (Nelson 1996) i DNA-Pol β , koje zaobilaze pirimidinske dimere koji blokiraju sintezu DNA pomoću mnogih drugih DNA-polimeraza, te DNA-

Pol i DNA-Pol koje sintetiziraju nasuprot svakakvim ošte enjima (Kunkel 2000). Važnost ovih polimeraza možemo uvidjeti iz injenice da inaktivacijom ljudske DNA-polimeraze dolazi do razvoja sindroma xeroderma pigmentosum, pri emu oboljeli imaju veliku sklonost ka razvoju raka (Johnson 1999).



Slika 14. Prikaz polimeraznog aktivnog mjesta Dpo4, DNA-polimeraze iz obitelji Y, prilikom zaobilaženja abazi nog mjesta. Domene su obojane kao i na slici 13. Crvena strelica ukazuje na izbani analog abazi nog mjesta. Nukleotid koji se nalazi 5' od abazi nog mjesta služi kao baza kalup za direktnu ugradnju nukleotida. Dva metalna iona su ljubi aste kuglice. Preuzeto iz Yang 2007.

5. LITERATURA

- Batra V. K., Beard W. A., Shock D. D., Pedersen L. C., Wilson S. H. 2008. Structure of DNA polymerase β active site mismatches suggest a transient abasic site intermediate during misincorporation. *Mol. Cell* **30**, 315-324
- Beard W.A., Wilson S. H. 2003. Structural Insight into the Origins of DNA Polymerase Fidelity. *Structure* **11**, 489-496
- Francklyn C. S. 2008. DNA Polymerases and Aminoacyl-tRNA Synthetases: Shared Mechanisms for Ensuring the Fidelity of Gene Expression. *Biochemistry* **47**, 11695-11703
- Johnson K. A., 1993. Conformational coupling in DNA polymerase fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 685-713
- Kool E. T. 1998. Replication of non-hydrogen bonded bases by DNA polymerases: a mechanism for steric matching. *Biopolymers* **48**, 3-17
- Kunkel T. A., 2004. DNA replication fidelity. *J. Biol. Chem.* **279**, 16895-16898.
- Kunkel T. A., Bebenek K. 2000. DNA Replication Fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 497-529
- Osheroff W. P., Beard W. A., Yin S., Wilson S. H., Kunkel T. A. 2000. Minor groove interactions at the DNA polymerase β active site modulate single-base deletion error rates. *J. Biol. Chem.* **275**, 28033-28038
- Patel P. H., Loeb L. A. 2001. Getting a grip on how DNA polymerases function. *Nature* **8**, 656-659
- Steitz T. A. 1999. DNA polymerases: Structural Diversity and Common Mechanisms. *J. Biol. Chem.* **274**, 17395-17398
- Yang W., Woodgate R. 2007. What a difference a decade makes: Insights into translesion DNA synthesis. *PNAS* **104**, 15591-15598

<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch7F3.htm>

<http://web.virginia.edu/Heidi/chapter12/chp12.htm>

6. SAŽETAK

DNA-polimeraze su kompleksni, multikomponentni enzimi koji kataliziraju reakciju sinteze DNA. One postižu brzine sinteze koje su sukladne fiziološkoj brzini rasta, a uz to postižu relativno visoke stope vjernosti replikacije. Cilj ovog seminara je bio objasniti kako DNA-polimeraze to postižu. Pokazalo se da ovi enzimi to postižu korištenjem različitih domena za polimerizaciju i korekciju, s antagonistima kim katalitičkim funkcijama.

Možemo izvući i općeniti zaključak da su za visoku vjernost sinteze DNA odgovorni komplementarnost baza, inducirano pristajanje i 3'-5' egzonukleazna aktivnost. Prvo, imamo potpunu selekciju pravilnih parova baza na temelju geometrije. Zatim, vezanjem odgovarajućeg nukleotida nastaje konformacijska promjena koja pruža steričku provjeru geometrije para baza, nakon čega slijedi brza ugradnja nukleotida u rastući polimer. Ugradnjom krive baze dolazi do inhibicije ove konformacijske promjene kao i inhibicije polimerizacije, čime se omogućuje prebacivanje novosintetiziranog lanca u mjesto za popravljivanje gdje se 3'-5' egzonukleaznom aktivnošću odstranjuje krivo ugrađena baza. Sveukupna vjernost replikacije dolazi i do vrijednosti od jedne greške na 10^{10} ugrađenih nukleotida, što je kombinacija selektivnosti u polimerizaciji (10^5 - 10^6) i korektivnoj aktivnosti (10^3 - 10^6). Također, uz polimeraze koje postižu visoku vjernost replikacije imamo i one koje nisu toliko vjerne, ali ni specifične, te su stoga pogodne za replikaciju oštećenih molekula DNA, koju ne mogu provoditi obične DNA-polimeraze.

Potrebno je napomenuti da nijedna DNA-polimeraza ne djeluje sama. Replikacija DNA uključuje ogromne komplekse DNA-polimeraza sa mnoštvom pomoćnih proteina koji na razne načine utječu na njenu procesivnost i efikasnost. Budući da kompleksnost polimerizacijskih reakcija *in vitro* nije ni približna onima u stanici, preostaju nam mnoga istraživanja koja će nam dati jasniju i detaljniju sliku kako zapravo stanice repliciraju svoj genom.

7. SUMMARY

DNA-polymerases are complex, multidomain enzymes that catalyze reactions of DNA replication. They achieve rates of synthesis that support physiological growth rates and yet preserve relatively high fidelity. The goal of this seminar was to explain how do they manage to do that. It has been shown that they achieve that by using distinct domains for polymerization and for proofreading, with antagonistic catalytic functions.

We can draw general conclusion that high fidelity synthesis of DNA are driven by several factors: complementary base pairing, induced fit and 3'-5' exonuclease activity. Firstly, initial selection of correct base pair is achieved on the basis of geometry. Then, binding of the correct nucleotide induces conformational change, which provides steric check for the proper base pair geometry, followed by a rapid incorporation of nucleotide into the growing polymer. Mismatch inhibits this conformational change as well as polymerization, allowing the transfer of newly synthesized chain into editing site, where the incorrect base is removed by 3'-5' exonuclease. The overall fidelity approaches one error in 10^{10} by a combination of selectivity in polymerization (10^5 - 10^6) and in proofreading (10^3 - 10^4). Also, beside the high fidelity polymerases there are low fidelity ones, which are not so specific, and are therefore suitable for the replication of damaged DNA molecules, which can not be carried out by normal DNA-polymerases.

It is necessary to note that no DNA-polymerase works alone. DNA replication involves huge complexes of DNA-polymerases with multitude accessory proteins, which in many ways affect its processivity and efficiency. Since the complexity of polymerization reactions *in vitro* does not even approximate those in the cell, many research remains to be done that will give us a clearer and more detailed picture of how do cells replicate their own genome.

